

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-300265

(P2000-300265A)

(43) 公開日 平成12年10月31日 (2000. 10. 31)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/245		C 0 7 K 14/245	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平11-110914

(22) 出願日 平成11年4月19日 (1999. 4. 19)

(71) 出願人 597145779

アマシャム ファルマシア バイオテック株  
式会社

東京都新宿区百人町3丁目25番1号 サン  
ケンビルディング

(72) 発明者 後藤 雅式

東京都大田区多摩川2-5-11-205

(72) 発明者 ロバート エフ. ウィッティア

茨城県土浦市桜ヶ丘町31-14

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2本鎖核酸中のミスマッチ検出方法および変異を有する核酸の検出方法、並びにミスマッチを有する2本鎖核酸の分離方法

(57) 【要約】

【課題】 MutMタンパク質を用いて、効率よく核酸中のミスマッチまたは変異を検出する方法および効率よくミスマッチを有する核酸を分離する方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 MutMタンパク質が、核酸中のシトシンを含む全てのミスマッチに対して認識能力を有することを見出した。このMutMタンパク質の性質を利用して、効率的に2本鎖核酸中のミスマッチを検出し、また、2本鎖核酸試料からミスマッチを有する2本鎖核酸を分離することができることを見出した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2本鎖核酸中のミスマッチを検出する方法であって、(a) 被検2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる工程、(b) 該2本鎖核酸と該タンパク質との結合を検出する工程、を含む方法。

【請求項2】 MutMタンパク質が大腸菌由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 被検2本鎖核酸が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 MutMタンパク質が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】 被検2本鎖核酸が検出可能に標識されている、請求項1、2または4に記載の方法。

【請求項6】 MutMタンパク質が検出可能に標識されている、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 核酸中の変異を検出する方法であって、(a) 被検核酸および対照核酸を提供する工程、

(b) 該被検核酸と対照核酸をハイブリダイズさせる工程、(c) ハイブリダイズにより形成した2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる工程、(d) 該2本鎖核酸中のヘテロ2本鎖核酸と該タンパク質との複合体を検出する工程、を含む方法。

【請求項8】 MutMタンパク質が大腸菌由来である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 被検核酸または対照核酸が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】 MutMタンパク質が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、請求項7または8に記載の方法。

【請求項11】 被検核酸または対照核酸が検出可能に標識されている、請求項7、8または10に記載の方法。

【請求項12】 MutMタンパク質が検出可能に標識されている、請求項7から9のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 2本鎖核酸試料からミスマッチを含む2本鎖核酸を分離する方法であって、(a) 2本鎖核酸試料をMutMタンパク質に接触させる工程、(b) 2本鎖核酸試料からMutMタンパク質と複合体を形成する2本鎖核酸を回収する工程、を含む方法。

【請求項14】 2本鎖核酸試料からミスマッチを含まない2本鎖核酸を分離する方法であって、(a) 2本鎖核酸試料をMutMタンパク質に接触させる工程、(b) 2本鎖核酸試料からMutMタンパク質と結合しない2本鎖核酸を回収する工程、を含む方法。

【請求項15】 MutMタンパク質が大腸菌由来である、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】 2本鎖核酸がDNA増幅産物である、請

求項13から15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 MutMタンパク質が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、請求項13から16のいずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、MutMタンパク質を用いる、2本鎖核酸中のミスマッチ検出方法および変異を有する核酸の検出方法、並びにミスマッチを有する2本鎖核酸の分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】大腸菌MutSは、ミスマッチを認識、結合するタンパク質である[S-Su et al., J. Biol. Chem., 263, 6829-6835 (1988)]。近年、MutSを用いたミスマッチ検出、遺伝子診断法が開発されている[M. Gotoh et al., Genet. Anal., 14, 47-50 (1997)]。しかし、MutSはミスマッチ塩基の種類によって結合の強さが異なることが知られている。特に、ビリミジン・ビリミジンのミスマッチに対する結合は弱い[M. Gotoh et al., Genet. Anal., 14, 47-50 (1997)]。よって、遺伝子診断に応用した場合、変異を見落とす可能性が大きかった。

【0003】一方、大腸菌MutMはグアニン/シトシン→チミン/アデニンのトランスポージョン変異を抑制するタンパク質である[M. Cabrera et al., J. Bacteriol., 170, 5405-5407 (1988)]。このようなトランスポージョン変異の抑制は、大腸菌MutMがDNA中の酸化された塩基である8-オキシグアニンとシトシンのミスペアを認識し、除去することにより行なわれている[M. L. Michaelis et al., Biochemistry, 31, 10964-10968 (1992)]。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、MutMタンパク質を用いて、効率よく核酸中のミスマッチまたは変異を検出する方法および効率よくミスマッチを有する核酸を分離する方法を提供することを課題とする。これにより、従来のMutSタンパク質を利用した方法では困難であった、ビリミジン同士のミスマッチを効率よく検出し、またこのようなミスマッチを有する核酸を分離する方法が提供される。

【0005】また、本発明の特定の態様として、MutMタンパク質によるミスマッチの認識能力を利用した遺伝子診断方法およびDNA増幅産物の精製方法が提供される。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、大腸菌MutMタンパク質のDNA中のミスマッチ認識能力につき鋭意検討を行った結果、該MutMタンパク質が、シトシンを含む全てのミスマッチに対して認識能力を有することを見出した(図1)。さらに、1つのミスマッチのみならず、複数の連続したミスマッチに対しても、MutMタンパク質が結合することを見出した(図2)。また、1塩基対1塩基のミスマッチのみならず、2本鎖核酸の片側の鎖に

さらに複数の塩基が挿入された形態である、1塩基対複数塩基のミスマッチに対しても、MutMタンパク質は結合することが判明した(図3)。そして、2本鎖核酸の片側の鎖に1または複数の塩基の欠失または挿入によって生じるミスマッチに対しても、MutMタンパク質が結合することを見出した(図4)。

【0007】さらに、本発明者らは、大腸菌MutMタンパク質を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応産物中からミスマッチを含むDNAとミスマッチを含まないDNAとを分離することに成功した。即ち、本発明者らは、MutMタンパク質を用いて、DNA中のミスマッチの検出やミスマッチを有するDNAの分離を行うことが可能であることを見出した。

【0008】さらに、本発明者らは、このようなMutMタンパク質の能力を遺伝子診断などへ応用しうることを見出した。

【0009】即ち、本発明は、MutMタンパク質を用いた2本鎖核酸中のミスマッチ検出方法および変異を有する核酸の検出方法、並びにMutMタンパク質を用いたミスマッチを有する2本鎖核酸の分離方法および変異を有する核酸の分離方法に関し、より具体的には、(1) 2本鎖核酸中のミスマッチを検出する方法であって、(a)

被検2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる工程、  
(b) 該2本鎖核酸と該タンパク質との結合を検出する工程、を含む方法、(2) MutMタンパク質が大腸菌由来である、(1)に記載の方法、(3) 被検2本鎖核酸が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、(1)または(2)に記載の方法、  
(4) MutMタンパク質が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、(1)または(2)に記載の方法、(5) 被検2本鎖核酸が検出可能に標識されている、(1)、(2)または(4)に記載の方法、(6) MutMタンパク質が検出可能に標識されている、(1)から(3)のいずれかに記載の方法、  
(7) 核酸中の変異を検出する方法であって、(a)

被検核酸および対照核酸を提供する工程、(b) 該被検核酸と対照核酸をハイブリダイズさせる工程、

(c) ハイブリダイズにより形成した2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる工程、(d) 該2本鎖核酸中のヘテロ2本鎖核酸と該タンパク質との複合体を検出する工程、を含む方法、(8) MutMタンパク質が大腸菌由来である、(7)に記載の方法、(9) 被検核酸または対照核酸が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、(7)または(8)に記載の方法、(10) MutMタンパク質が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、

(7)または(8)に記載の方法、(11) 被検核酸または対照核酸が検出可能に標識されている、(7)、(8)または(10)に記載の方法、(12) MutMタンパク質が検出可能に標識されている、(7)から

(9)のいずれかに記載の方法、(13) 2本鎖核酸試料からミスマッチを含む2本鎖核酸を分離する方法であって、(a) 2本鎖核酸試料をMutMタンパク質に接触させる工程、(b) 2本鎖核酸試料からMutMタンパク質と複合体を形成する2本鎖核酸を回収する工程、を含む方法、(14) 2本鎖核酸試料からミスマッチを含まない2本鎖核酸を分離する方法であって、(a) 2本鎖核酸試料をMutMタンパク質に接触させる工程、

(b) 2本鎖核酸試料からMutMタンパク質と結合しない2本鎖核酸を回収する工程、を含む方法、(15) MutMタンパク質が大腸菌由来である、(13)または(14)に記載の方法、(16) 2本鎖核酸がDNA増幅産物である、(13)から(15)のいずれかに記載の方法、(17) MutMタンパク質が支持体に結合しているかまたは支持体に結合可能に標識されている、(13)から(16)のいずれかに記載の方法、に関する。  
【0010】なお、本発明において「ミスマッチ」とは、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)(RNAの場合はウラシル(U))から選択される一組の塩基対が正常な塩基対(A/TまたはG/C)ではないことを指す。本発明において「ミスマッチ」には、1つのミスマッチのみならず、複数の連続したミスマッチ、1または複数の塩基の挿入および/または欠失により生じるミスマッチ、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。

【0011】また、本発明において「変異」とは、対照核酸と比較した場合における被検核酸中の異なる塩基(2本鎖核酸の場合には塩基対)を指す。

【0012】また、本発明において「核酸」という場合には、DNAおよびRNA、例えば、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、合成ポリヌクレオチドを含む。また1本鎖核酸および2本鎖核酸、並びに直鎖状核酸および環状核酸を含む。

【0013】また、本発明において「対照核酸」とは、変異を有しない核酸を指す。また、「被検核酸」とは、対照核酸と異なる塩基(変異)を有することが疑われる核酸を指す。被検核酸は、変異を有しなければ対照核酸と同一の核酸であり、変異を有すれば、該変異部位のみ対照核酸と異なる核酸である。例えば、遺伝子病が疑われる患者の遺伝子における変異を検出する場合において変異を有することが疑われる患者の遺伝子は被検核酸であり、この遺伝子に対応する健常者の遺伝子は対照核酸である。

【0014】また、本発明において「ヘテロ2本鎖核酸」とは、実質的には相補的な2本鎖核酸であるが、1または複数のミスマッチを有することにより非相補的な領域を含んでいる2本鎖核酸を指す。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明は、第一に、MutMタンパク質を利用した2本鎖核酸中のミスマッチを検出する方法

に関する。本発明の方法は、2本鎖中のミスマッチに対するMutMタンパク質の認識能力を利用する方法であり、MutMタンパク質の被検2本鎖核酸への結合を指標とする。従って、本発明の方法は、(a) 被検2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる工程、および(b) 該2本鎖核酸と該タンパク質との結合を検出する工程、を含む。

【0016】本発明の方法は、シトシンを含むミスマッチ塩基対(C/A, C/T, C/C)の検出に特に好適である。また、複数の連続したミスマッチの検出や、1塩基対複数塩基のミスマッチ、さらには2本鎖核酸の少なくとも片側の鎖における1または複数の塩基の欠失および/または挿入によって生じるミスマッチの検出にも好適に適用することができる。特にシトシンを含むミスマッチの検出に好適に用いられうる。

【0017】本発明の方法に用いられる「MutMタンパク質」としては、大腸菌由来のMutMタンパク質が好適であるが、2本鎖核酸中のミスマッチを認識しうる限りその由来に制限はない。現在までに知られている大腸菌以外のMutMホモログタンパク質としては、酵母Ogg1およびOgq2 [P.A. van der Kemp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5197-5202 (1996)]、マウスOgg1 [T.A. Ro senquist et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7429-7434 (1997)]、サーマス・サーモフィラス(Thermus thermophilus) MutM [T. Mikawa et al., Nucleic Acids Res. 26, 903-910 (1998)]、アラビドプシス・サリアナ(Arabidopsis thaliana) AtMMH1およびAtMMH2 [T. Ohtsubo et al., Mol. Gen. Genet., 259, 577-590 (1998)]、ヒトOgg1 [K. Arai et al., Oncogene, 14, 2857-2861 (1997)]等が知られている。また、2本鎖核酸中のミスマッチを認識しうる限り、これらタンパク質の部分ペプチドであってもよい。

【0018】また、2本鎖核酸中のミスマッチを認識しうる限り、天然型のタンパク質のアミノ酸配列中、1つ若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および/または挿入したアミノ酸配列からなるタンパク質(変異体)であってもよい。このような変異体は、自然界において生じることもあるが、人為的に調製することも可能である。タンパク質にアミノ酸変異を導入する方法としては、多くの方法が公知である。例えば、部位特異的変異導入法として W.P. Deng et al. J.A. Nickoloffの方法 [Anal. Biochem., 200, 81 (1992)]や、K.L. Makamaya et F. Ecksteinの方法 [Nucleic Acids Res., 14, 9679-9698 (1986)]、ランダム変異導入法としては、基本的な修復系を欠損した大腸菌 XL1-Red 株(Stratagene社)を用いる方法、亜硝酸ナトリウム等を用い化学的に塩基を修飾する方法 [J.-J. Diaz et al., BioTechnique, 11, 204-211 (1991)]等が知られている。

【0019】また、MutMタンパク質はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等、他のタンパク質との融合タンバ

ク質等であってもよい。

【0020】MutMタンパク質は、天然のタンパク質として、または組換えタンパク質として、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画等を組み合わせた公知の方法 [S. Boiteux et al., EMBO J., 6, 3177-3183 (1987)]により調製することが可能である。また、組換えタンパク質で発現量が多い場合には、陽イオン交換カラムおよびゲル濾過カラムを用いたクロマトグラフィーのみにより容易に調製することも可能である。

【0021】本発明における2本鎖核酸としては、ミスマッチを有するか否かを検出したい所望の2本鎖核酸を用いることが可能である。2本鎖核酸は、2本鎖DNA、2本鎖RNA、DNA/RNAのいずれであってもよい。2本鎖核酸は、直接検査に用いることもできれば、ファージやプラスミドを含むベクターで増幅されたものを用いてもよい。また、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等で増幅されたものを用いてもよい。

【0022】本発明の方法における被検2本鎖核酸とMutMタンパク質との接触は、該タンパク質が被検2本鎖核酸中のミスマッチ領域に結合しうる条件(例えば、適当なpH、溶媒、イオン環境、温度)で行なわれる。例えば、バッファーの組成として、50 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTTが挙げられる。温度は、例えば25°C、反応時間は1分~10分程度で行うことができる。上記の条件は一例であり、反応温度や塩濃度、イオンの種類、バッファーのpH等の詳細な条件は適宜選択することができる。

【0023】また、2本鎖核酸を形成させる過程で1本鎖核酸が残っていると予想される場合には、例えばMicroSpin S-300 HR カラム(アマシャム ファルマシア バイオテック社)で1本鎖核酸を除去するか、または予め大腸菌SSBタンパク質などで1本鎖核酸をブロックすることが好ましい。

【0024】被検2本鎖核酸とMutMタンパク質との結合を検出するための方法には、特に制限はない。例えば、以下のような検出系が考えられる。

【0025】① 被検2本鎖核酸を支持体に固定、または支持体に固定可能に標識し、MutMタンパク質は標識せずに使用する。核酸を支持体に固定可能に標識するには、互いに親和性を有する物質の一方を核酸へ、他の一方を支持体に結合させればよい。このような物質としては、例えば、ビオチン-アビジン系、抗体-抗原系(ジゴキシゲニン抗体およびジゴキシゲニンなど)を用いればよい。検出系としては、例えば水晶発振子や表面プラズモン共鳴、多孔質シリコンを応用したセンサーで直接MutMタンパク質を検出することができる。支持体としては、例えば水晶発振子上の金や表面プラズモンセンサーの検出素子上の金、多孔質シリコンセンサーのシリコン上に直接、またはデキストラン等のマトリックスを介し

て固定することができる [K. Bondeson et al., FEBS Letter, 423, 307-313 (1993)].

【0026】② 被検2本鎖核酸を支持体に固定、または支持体に固定可能に標識して使用し、MutMタンパク質と反応後、核酸と結合しなかったMutMタンパク質を除去し、残ったMutMタンパク質を検出する。核酸を支持体に固定可能に標識するには、ビオチンや、抗体で認識され得る化合物を用いればよい。MutMタンパク質は、検出可能な化合物で標識してもよい。この場合、MutMタンパク質は、例えば<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H等の放射線標識、FITC等の蛍光物質、ビオチン、またはFITC等抗体で認識され得る化合物などで標識することができる。また、MutMタンパク質に対する抗体を用いれば、MutMタンパク質を標識しなくても検出することが可能である。なお、抗体とMutMタンパク質との複合体に対し、さらに別の抗体を結合させて検出することも可能である。抗体は、アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、またはβ-ガラクトシダーゼ等が結合したものをを用いることができる。このような場合、検出系としては、アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、β-ガラクトシダーゼなどの活性を利用した公知の発色法、化学発光法により検出することができる。放射線標識や蛍光物質標識の場合には直接検出が可能である。支持体としては、メンブレンフィルター、マイクロタイタープレート、クロマトグラフィー担体、磁気ビーズ等の固液分離可能な支持体であればよい。固液分離は、ビオチンであればアビジンやストレプトアビジン、抗体で認識されうる化合物であれば抗体を支持体に固定化したものをを用いればよい。抗体の固定化は、物理的な吸着や化学的な架橋剤により直接、またはプロテインAやプロテインGを介して行うことができる。

【0027】③ 被検2本鎖核酸を検出可能に標識し、MutMタンパク質は支持体に固定、または支持体に固定可能に標識して使用する。核酸の標識としては、<sup>32</sup>Sや<sup>32</sup>P等の放射線標識、FITCやCy5等の蛍光物質標識、HRP等の酵素標識、ビオチン、FITC、またはジゴキシンゲン等、アビジン、ストレプトアビジン、または抗体等で検出可能な化合物による標識などが挙げられる。MutMタンパク質は物理的な吸着や化学的な架橋剤により直接支持体に固定化することができる他、ビオチンまたは抗体で認識可能な化合物 (抗原) を用いて標識しておき、ビオチンであればアビジンやストレプトアビジン、抗原であれば抗体等を介して支持体に固定することができる。また、MutMのN-末端側、あるいはC-末端側に短いヒスチンタグを付け、そのキレート作用を利用して、金属を介した固定化法も用いることができる。検出系および用いられる支持体は、上記②と同様である。

【0028】④ 被検2本鎖核酸を検出可能に標識して使用し、MutMタンパク質は標識せずに、抗MutM抗体を用いて免疫沈降などの固液分離を行う。MutMタンパク質に

対する抗体は、ビーズ等の支持体に結合させたプロテインAやプロテインGを介して固定化できる。核酸の標識は、③と同様に行うことができる。また、検出系および用いられる支持体は、上記②と同様である。

【0029】⑤ 被検2本鎖核酸は標識せず、また、MutMタンパク質は支持体に固定、または支持体に固定可能に標識して使用する。支持体へ固定可能な標識は、③と同様である。検出系は、①と同様に、例えば水晶共振子や表面プラズモン共鳴、多孔質シリコンを応用したセンサーで直接2本鎖核酸を検出することができる。支持体は①と同様であり、表面プラズモン共鳴センサーの検出素子へのタンパク質の固定法としては I. Chaikenらの方法が挙げられる [Anal. Biochem., 201, 197-210 (1992)]。

【0030】この結果、被検2本鎖核酸とMutMタンパク質との有意な結合が検出されれば、該2本鎖核酸中にミスマッチが存在すると判定され、一方、被検2本鎖核酸とMutMタンパク質との有意な結合が検出されなければ、該2本鎖核酸中にミスマッチは存在しないと判定される。

【0031】本発明のミスマッチの検査方法は、ミスマッチの定量も含まれる。例えば、標識したタンパク質や抗体を用いてミスマッチを有する核酸に結合したMutMタンパク質量を測定することにより、核酸試料中に存在するミスマッチの量を決定することが可能である。また、核酸試料全体を標識し、MutMタンパク質を結合させ、核酸試料全体に占める複合体を形成した核酸の割合を測定することで、試料中に存在するミスマッチDNAの割合を決定することも可能である。

【0032】また、本発明は、MutMタンパク質を利用した核酸中の変異を検出する方法に関する。この検出方法は、一つの態様として、遺伝子病患者の罹病が疑われる患者において特定の遺伝子に変異を有するか否かを調べるため、患者由来の遺伝子と健常者の遺伝子が同一の塩基配列を有するか否かを調べることに利用することができる。本発明の方法においては、被検遺伝子のいかなる位置に変異が存在しても検出することが可能であり、検査対象となる遺伝子の変異部位や変異の種類が既知である必要はない点でも優れている。

【0033】この検出方法の原理は、以下の如くである。変異を有することが疑われる被検核酸と対照核酸 (変異を有しない核酸) とを調製し、これらを互いにハイブリダイズさせる。この結果、被検核酸が変異を有すれば、対照核酸とのハイブリダイズによりヘテロ2本鎖核酸 (ミスマッチを有する核酸) が生じる。一方、被検核酸に変異がなければ、ホモ2本鎖核酸のみが生じ、ヘテロ2本鎖核酸は生じない。ハイブリダイズにより形成された2本鎖核酸に対し、MutMタンパク質を接触させた場合、MutMタンパク質はミスマッチを有するヘテロ2本鎖核酸には結合するが、ホモ2本鎖核酸には結合しな

い。従って、このMutMタンパク質の2本鎖核酸への結合を検出することにより、被検核酸が変異を有するか否かを判定できる。

【0034】即ち、本発明の検出方法は、(a) 被検核酸および対照核酸を提供する工程、(b) 該被検核酸と対照核酸をハイブリダイズさせる工程、(c) ハイブリダイズにより形成した2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる工程、(d) 該2本鎖核酸中のヘテロ2本鎖核酸と該タンパク質との複合体を検出する工程、を含む。

【0035】用いられる被検核酸としては、特に制限はなく、変異を有するか否かを検出したい所望の核酸を用いることができる。また、対照核酸は、被検核酸に対応する核酸であって、仮に被検核酸が変異を有しなければ、被検核酸と同一の核酸を用いる。この同一とは、両者がハイブリダイズする領域において同一の意味であり、長さに相違があってもよいが、可能であれば長さも揃えることが望ましい。被検核酸および対照核酸は、1本鎖であっても2本鎖であってもよいが、両者が1本鎖の場合には、仮に被検核酸が変異を有しなければ、互いに相補鎖である。

【0036】本発明の方法においては、被検核酸と対照核酸をハイブリダイズさせる（但し、2本鎖である場合は、変性して一本鎖に解離させて、両者をハイブリダイズさせる）。これにより、2本鎖核酸を形成させる（2本鎖核酸は被検核酸に変異がある場合には、ヘテロ2本鎖核酸とホモ2本鎖核酸の混合物となり、被検核酸に変異がない場合には、ホモ2本鎖核酸のみとなる）。

【0037】2本鎖核酸の変性方法としては、例えば、溶液のpHを酸性またはアルカリ性にする方法と、溶液を高温にする方法が挙げられる。pHを変化させる方法としては、例えば 0.1M NaOH、0.1M HCl溶液に置換する方法が挙げられる。また、温度を上げる方法は、核酸の融解温度(Tm)以上にすればよいが、通常、95°C程度が用いられる。

【0038】ハイブリダイズは、溶液のpHを中性に戻すこと、または温度を徐々に下げ Tm以下にすることにより容易に行うことができる。例えば、200塩基対の核酸の場合、6×SSC溶液（90mM クエン酸ナトリウム(pH 7.2)、0.9M NaCl）中で、被検核酸と対照核酸を等モル数、またはどちらかの核酸を過剰に添加し、一度温度を95°Cに加熱後、30分から2時間程度の時間をかけ徐々に室温まで冷やす。その後、ハイブリダイズしなかった1本鎖核酸を除去する場合には、MicroSpin S-300 HRカラム（アマシャム ファルマシア バイオテック社）等で処理する。

【0039】本発明の方法においては、次いで、ハイブリダイズにより形成された2本鎖核酸をMutMタンパク質に接触させる。用いられるMutMタンパク質としては、上記ミスマッチの検出方法の場合と同様である。その後、

該2本鎖核酸とMutMタンパク質との結合を、前記の被検2本鎖核酸とMutMタンパク質との結合の検出と同様にして検出する。

【0040】検出系におけるバリエーションは前記と同様である。但し、核酸を支持体に固定または支持体に固定可能に標識する場合、被検核酸を固定または標識してもよければ、対照核酸を固定または標識してもよい。また、核酸を検出可能に標識する場合も、被検核酸を標識するか、対照核酸を標識するかは問わない。

10 【0041】この結果、ハイブリダイズにより形成した2本鎖核酸とMutMタンパク質との有意な結合が検出されれば被検核酸中に変異が存在すると判定され、一方、2本鎖核酸とMutMタンパク質との有意な結合が検出されなければ被検核酸中に変異が存在しないと判定される。

【0042】また、本発明は、MutMを利用した、2本鎖核酸試料からミスマッチを含む2本鎖核酸またはミスマッチを含まない2本鎖核酸を分離する方法に関する。本発明の方法の原理は以下の如くである。まず、ヘテロ2本鎖核酸を含むことが予想される2本鎖核酸試料を調製し、これに対しMutMタンパク質を接触させる。MutMタンパク質は、2本鎖核酸試料中のヘテロ2本鎖核酸にのみ結合するため、MutMタンパク質を接触させた2本鎖核酸試料からMutMタンパク質を回収すれば、該タンパク質に結合しているヘテロ2本鎖核酸も同時に回収される。反対に、2本鎖核酸試料中からMutMタンパク質およびこれに結合する2本鎖核酸を除いたものを回収すれば、これはホモ2本鎖核酸となる。

【0043】即ち、本発明のミスマッチを含む2本鎖核酸の分離方法は、(a) 2本鎖核酸試料をMutMタンパク質に接触させる工程、(b) 2本鎖核酸試料からMutMタンパク質と複合体を形成する2本鎖核酸を回収する工程、を含む。

【0044】一方、本発明のミスマッチを含まない2本鎖核酸の分離方法は、(a) 2本鎖核酸試料をMutMタンパク質に接触させる工程、(b) 2本鎖核酸試料からMutMタンパク質と結合しない2本鎖核酸を回収する工程、を含む。

【0045】上記の方法において、必要に応じて工程(a)および(b)を複数回繰り返すことにより、精製度を上昇させることもできる。

【0046】これらの方法は、種々の遺伝子クローニングに有用である。ミスマッチを含む2本鎖核酸の分離方法は、例えば1塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)の回収のために用いることができる。近年、ヒトゲノム解析が進み、遺伝子の変異と病気との関係を解明するため、世界中で様々なSNP収集が始められている。本発明は、ミスマッチ核酸のみを回収できるため、SNP収集に適している。ミスマッチを含む2本鎖核酸の分離方法は、また、ある遺伝子のホモログ遺伝子をクローニングするために有用である。例えば配列が明らか

になっている遺伝子と同等な他生物の遺伝子をクローニングする場合、ある程度配列が似ており、かつ部分的に異なる遺伝子を選択することが可能である。また、同じ生物であっても、遺伝子配列が似ているが完全に同一ではない遺伝子を選択的にクローニングすることが可能である。

【0047】一方、ミスマッチを含まない2本鎖核酸の分離方法は、DNA増幅産物の精製に有用である。ある遺伝子をクローニングする場合、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などで増幅したDNA断片をクローニングベクターに挿入することが多い。このとき、DNAポリメラーゼにより、PCR増幅産物に変異が導入されてしまう場合がある。本発明の方法により、変異の導入されたDNA増幅産物を除去することが可能である。

【0048】これらの分離を行うには、具体的には、例えば溶液中でMutMタンパク質と2本鎖核酸を反応させた後、抗MutM抗体を作用させる。その後、ビーズ等の支持体に結合したプロテインAまたはプロテインGを作用させ、遠心分離により免疫複合体を沈降させ、ミスマッチを含まない2本鎖核酸およびミスマッチを含む2本鎖核酸を、それぞれ上清および沈殿に分離させ回収する。沈殿からミスマッチを含む2本鎖核酸を精製するには、沈殿をTEバッファー(10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mMEDTA)に懸濁した後、3倍量の3M グアニジン塩酸を加え、MutMタンパク質を変性させ、2本鎖核酸を遊離させる。遠心分離後上清をDNA溶液として回収し、含まれるDNAをクローニングに使用することができる。

【0049】また、支持体に固定、または固定可能に標識したMutMタンパク質を使用して分離を行うことも考えられる。用いられる標識や支持体に制限はないが、支持体としては、例えば液体クロマトグラフィー担体、磁気ビーズ、各種センサーの検出素子等が考えられる。液体クロマトグラフィー担体としては、HiTrap NHS-activated(アマシャム ファルマシア バイオテック社)、磁気ビーズとしてはDynabeads M-450 UncoatedまたはM450-Tosylated(ダイナル社)、表面プラズモン共鳴センサーの検出素子としてはセンサーチップ CM5(ピアコア社)等が挙げられる。Dynabeads M-450 UncoatedはMutMタンパク質を物理的に、その他は化学的にそれぞれの支持体に結合することが可能である。例えば、HiTrap NHS-activatedの場合、担体であるSephroseのカルボキシル基がN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)でエステル化されている。1mM HClのような低いpHの溶液で保存塩基を置換し、MutMタンパク質溶液を流すと、MutMタンパク質のアミノ酸との間に安定なアミド結合が形成される。よって、2本鎖核酸と反応させ、ミスマッチを含む2本鎖核酸のみをトラップさせ、ミスマッチを含まない2本鎖核酸を分離、回収できる。MutMタンパク質に結合したミスマッチを含む2本鎖核酸は、3M グアニジン塩酸でMutMタンパク質を変性させることで、核酸のみを回収す

ることができる。

【0050】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0051】[実施例1]本実施例では、ミスマッチDNAと大腸菌MutMの結合解析にBIACORE社のアフィニティーセンサーを用いた。合成したビオチン化オリゴヌクレオチド(B-gttggaqacangtggtgttg/配列番号:1、Bはビオチンを表し、nはA、G、C、またはTを表す)を、約1,300 RU(1 RUは約1pg/mm<sup>2</sup>の物質密度に相当する)固定化したセンサーチップSA(BIACORE社)に、6×SSC(90mM クエン酸ナトリウム(pH7.2)、0.9M塩化ナトリウム)中で第2の合成オリゴヌクレオチド(ccaacaccacntgctccac/配列番号:2)をアニーリングした。この過程で、約1,200 RUのオリゴヌクレオチドがアニーリングした。残った1本鎖オリゴヌクレオチドを90μg/mlのSSB(1本鎖DNA結合タンパク質)を流してブロックした。そこに、約400nMの精製したMutMを流し、各2本鎖オリゴヌクレオチドに対する結合をモニターした。なお、ランニングバッファーとしてKClバッファー(50mM Hepes-KOH(pH7.2), 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 5mM MgCl<sub>2</sub>)を使用し、25°Cで全ての操作を行った。

【0052】その結果を図1に示す。A)はAとA、C、またはGのミスマッチおよびA/T相補2本鎖に対するMutMの相互作用、B)はCとA、C、またはTのミスマッチおよびC/G相補2本鎖に対するMutMの相互作用、C)はGとA、G、またはTのミスマッチおよびG/C相補2本鎖に対するMutMの相互作用、D)はTとC、G、またはTのミスマッチおよびT/A相補2本鎖に対するMutMの相互作用を示している。図では25秒から1分間、MutMを流しつづけ、85秒からKClバッファーに切換え非特異的な吸着物を洗い流した。図から明らかなように、MutMはC/C、C/TおよびT/C、ならびにC/AおよびA/Cに対する強い結合活性を示した。これに対して、A/T、C/G、G/C、T/Aといった相補2本鎖オリゴヌクレオチドには結合が見られなかった。

【0053】[実施例2]本実施例では、大腸菌MutMをDNA増幅産物の精製に使用した。5本のPCR Beads(アマシャム ファルマシア バイオテック社)に各25pmolの2種類のPCRプライマー(GTAGTTGAACAATTCCTGAATGACCCATTATC/配列番号:3; 下線部はEcoRI切断部位、およびACGCCCTGCAACCGGGTGAATGATCCGGAT/配列番号:4; 下線部はPstI切断部位)を添加し、全量25μlになるよう滅菌水を加えた。この溶液に1白金耳の大腸菌を懸濁し、アニーリング温度55°Cで30サイクルのPCR反応を行った。この反応で870塩基対のDNA断片が増幅された。反応後、25μlのTEバッファー(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を添加し、マイクロスピナラム(MicroSpin S-400 HR アマシャム ファルマシア バイオテック社)を用いて未反応プライマーを除去した。精製したPCR産物溶液50μlに

21μlの20×SSCバッファーを添加し、95°Cに加熱し、徐々に温度を下げることに伴いアニーリングを行った。再度、マイクロスピナールでアニーリングしなかった1本鎖DNAを除去し、等量の2×KClバッファーを添加した後、5分間静置し、以下に述べるMutM固定化アフィニティカラムに通した。

【0054】HiTrap NHS-activated カラム(アマシャムファルマシア バイオテク社)に、プロトコールに従い、100μMのMutM溶液1mlを固定化した。ブロッキング後、KClバッファーを流し平衡化した。このMutM固定化カラムにDNA溶液を通過させた。通過したDNA溶液を回収し、エタノール沈殿により10μlに濃縮した。制限酵素付属のOPAバッファー(アマシャムファルマシア バイオテク社)を3μl、制限酵素EcoRIを10ユニット、PstIを10ユニット添加し、滅菌水で全量を20μlにした。37°Cで2時間反応し、予めEcoRIとPstIで切断しておいた100ngの大腸菌ベクターpTrc99A(アマシャムファルマシア バイオテク社)と混ぜ、エタノール沈殿により全量を10μlとした。ライゲーション反応により、ベクターとPCR断片を連結し、大腸菌XL1-Blueに導入した。出現した17株の形質転換体に含まれるベクターの挿入DNAを増幅するため、最初に用いたPCRプライマーを使用し、コロニーPCRを行った。

【0055】挿入DNA中の変異導入効率の評価は、シーケンシングプライマー(Cy5-ACCGTCCGAACATCGGCGTAA/配列番号:5)を使用し、約300塩基の配列を解析することにより行った。その結果、塩基配列を解析した17株中には、変異が導入された挿入配列は存在しなかった。

【0056】[実施例3]本実施例では、MutMを変異のある遺伝子クローニングに利用した。実施例2で使用した、DNAを通過させたMutM固定化カラムに1mMの3M グアニジン塩酸を流して、結合したDNAを回収した。エタノール沈殿により10μlに濃縮した後、実施例2と同様の方法でDNAベクターpTrc99Aに挿入し、形質転換を行った。出現した3株の形質転換体中のベクターの挿入DNAの塩基配列を解析したところ、1株にG→Cの変異が見られた。

【0057】[実施例4]本実施例では、連続する異なる長さのミスマッチを有するDNAと大腸菌MutMの結合解析にアフィニティセンサーを用いた。合成したピオチン化オリゴヌクレオチド(B-tggttggttggaagcaggtggttggtgga/配列番号:6、B-tggttggttggaagcaggtggttggtgga/配列番号:7、B-tggttggttggaagcaggtggttggtgga/配列番号:8、B-tggttggttggaagcaggtggttggtgga/配列番号:9、あるいはB-tggttggttggaagcaggtggttggtgga/配列番号:10、Bはピオチンを表し、下線部はミスマッチを表す)を、約700RU固定化したセンサーチップSAに、6×SSC中で第2のオリゴヌクレオチド(配列番号:6および7に対してはttttcccaacaccacgtgctccaaccacca/配列番号:11、配列番号:8に対して

はttttcccaacaccacgtgctccaaccacca/配列番号:12、配列番号:9に対してはttttcccaacaccacgtgctccaaccacca/配列番号:13、配列番号:10に対してはttttcccaacaccacgtgctccaaccacca/配列番号:14、下線部はミスマッチを表す)をアニーリングした。ランニングバッファーをKClバッファーにしたのち、精製した200nMのMutMを流し、実施例1と同様に各2本鎖オリゴヌクレオチドに対する結合をモニターした。温度はすべて25°Cで行った。

10 【0058】その結果を図2に示す。連続するミスマッチの長さが長くなるにつれて結合するMutMの量は減少する傾向は見られたものの、コントロールとして用いた相補2本鎖と比較し、明らかに高い結合活性を示した。

【0059】[実施例5]本実施例では、C/Cミスマッチおよび片側の鎖に数塩基のCが挿入されたDNAと大腸菌MutMの結合解析にアフィニティセンサーを用いた。合成したピオチン化オリゴヌクレオチド(配列番号:7)を、約700RU固定化したセンサーチップSAに、実施例4と同様の条件で配列番号:11、12、13あるいは14をアニーリングし、実施例4と同様の方法でMutMの結合をモニターした。

【0060】その結果を図3に示す。挿入されたCの数が多くなるにつれて、結合するMutMの量は減少する傾向は見られたものの、250秒時点でも400RU以上の結合が見られ、このような変異もMutMにより検出できることが明らかになった。

【0061】[実施例6]本実施例では、挿入あるいは欠失変異DNAと大腸菌MutMの結合解析にアフィニティセンサーを用いた。合成したピオチン化オリゴヌクレオチド(配列番号:6)を約700RU固定化したセンサーチップSAに、実施例4と同様の条件で配列番号:11、12、13あるいは14をアニーリングし、実施例4と同様の方法でMutMの結合をモニターした。

【0062】その結果を図4に示す。この場合には、挿入される塩基が少ないほど結合量は減少する傾向が見られたが、いずれの場合にも、コントロールの相補DNAに比べると高い結合性を示した。

【0063】

【発明の効果】本発明により、MutMタンパク質が、核酸中のシトシンを含む全てのミスマッチを認識する能力を有することが見出され、このMutMタンパク質の性質を利用して効率的に2本鎖核酸中のミスマッチを検出することが可能となった。また、効率的にミスマッチを含む2本鎖核酸とミスマッチを含まない2本鎖核酸を分離することが可能となった。

【0064】本発明の方法によれば、従来のMutSタンパク質を利用した方法では困難であった、ピリミジン同士のミスマッチを効率よく検出し、またこのようなミスマッチを有する核酸を分離することが可能である。また、複数の連続したミスマッチの検出や、1塩基対複数塩基



のミスマッチ、さらには2本鎖核酸の片側の鎖に1または複数の塩基の欠失または挿入によって生じるミスマッチの検出にも好適に適用することができる。本発明の方法は、遺伝子診断やDNA増幅産物の精製など幅広い応用 \* が可能である。

【0065】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Amersham Pharmacia Biotech K.K.

<120> Methods for mismatch detection in double stranded nucleic acids, detection of nucleic acids containing mutations and preparation of double stranded nucleic acids containing mismatches.

&lt;130&gt; A2-001

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 14

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 1

gttggagcan gtggtgttg

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 2

ccaacaccac ntgctccaac

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 3

gtagtgaag aattcctgaa tgagccattt atc

33

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

17	18
<400> 4	
agcgcctgca gcggggtgag tgaatccgga t	31
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence	
<400> 5	
accggtccga acatgggcgg taaa	24
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence	
<400> 6	
tggtggttgg agcaggtggt gttgggaaaa	30
<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence	
<400> 7	
tggtggttgg agcacgtggt gttgggaaaa	30
<210> 8	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence	
<400> 8	
tggtggttgg agcacctggt tggtgggaaa a	31
<210> 9	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligonucleotide sequence	
<400> 9	
tggtggttgg agcacccgtg gtgtgggaa aa	32
<210> 10	
<211> 33	
<212> DNA	

19

20

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 10

tggtggttg agcaccctgt ggtgttggg aaa

33

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 11

ttttccaac accacctgt ccaaccacca

30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 12

ttttccaac accacctgt tccaaccacc a

31

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 13

ttttccaac accacctgt ctccaaccac ca

32

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized oligonucleotide sequence

&lt;400&gt; 14

ttttccaac accacctgt gctccaacca cca

33

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 MutMの結合特性の評価に使用したオリゴヌクレオチドの配列、およびその結果を示す図である。各図とも、左が使用したオリゴヌクレオチドで、2本鎖のうえに書かれた配列が固定化したオリゴヌクレオチド、下の配列がアニーリングした配列を示す。また、配列中の「N」は、A、C、G、またはTのうちいずれかの塩基を表

す。A)はAとNによるミスマッチを含む2本鎖あるいは相補2本鎖オリゴヌクレオチドに対する結合、B)はCとNによるミスマッチを含む2本鎖あるいは相補2本鎖オリゴヌクレオチドに対する結合、C)はGとNによるミスマッチを含む2本鎖あるいは相補2本鎖オリゴヌクレオチドに対する結合、D)はTとNによるミスマッチを含む2本鎖あるいは相補2本鎖オリゴヌクレオチドに対する結合を表

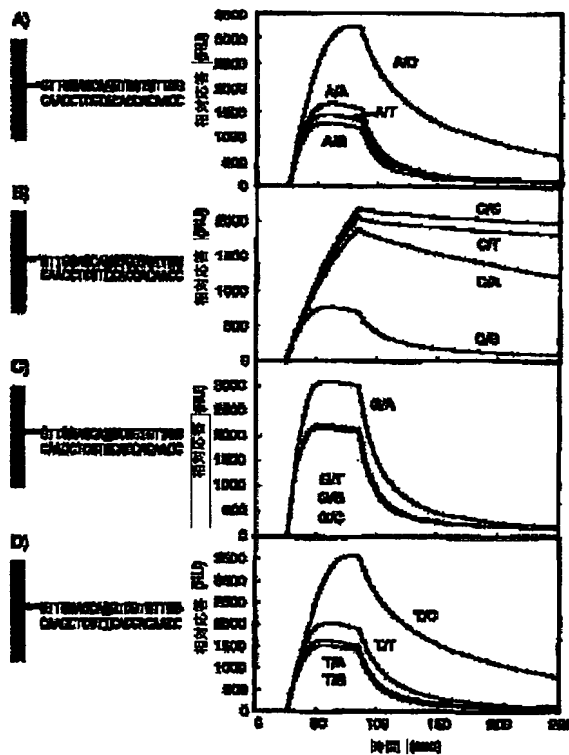
す。

【図2】連続する異なる長さのミスマッチを有するDNAに対するMutMタンパク質の結合解析の結果を示す図である。ミスマッチを含まないDNA (G/C) および C/C ミスマッチを 1~4つ連続して含むDNA (C/C, CC/CC, CCC/CC, CCCC/CCCC) に対するMutMの結合を表す。 \*

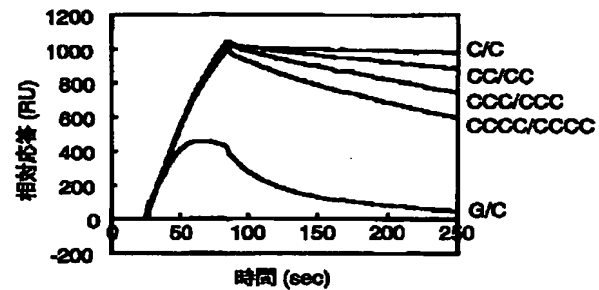
\* 【図3】 C/Cミスマッチおよび片側の鎖に数塩基のGが挿入されたDNAとMutMタンパク質の結合解析の結果を示す図である。

【図4】 挿入あるいは欠失変異DNAとMutMタンパク質の結合解析の結果を示す図である。

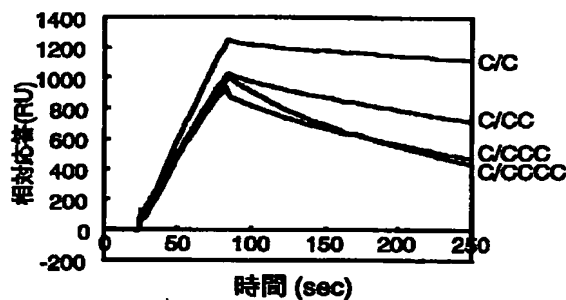
【図1】



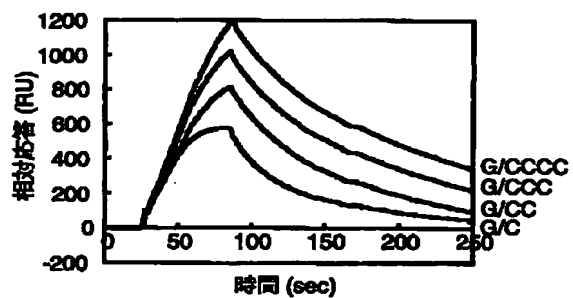
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01  
4B063 QA01 QA13 QA17 QQ42 QQ52  
QR48 QR82 QS34  
4H045 AA10 BA10 CA11 EA50